

АКТИВНОСТЬ КСАНТИНОКСИДОРЕДУКТАЗЫ: ОСОБЕННОСТИ ПРОФИЛЯ КРОВИ ПРИ СИСТЕМНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ

Мозговая Е.Э.¹, Бедина С.А.¹, Трофименко А.С.¹, Спицина С.С.¹, Мамус М.А.¹,
Зборовская И.А.¹

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной ревматологии имени А.Б. Зборовского», Волгоград, e-mail: ea.mozgovaya@gmail.com

В плазме крови, лизатах лимфоцитов и лизатах эритроцитов больных системными заболеваниями соединительной ткани была изучена активность ферментов системы ксантиноксидоредуктазы: ксантиноксидазы (КО, ЕС 1.17.3.2) и ксантиндегидрогеназы (КДГ, ЕС 1.17.1.4). В исследовании принимали участие 56 пациентов с системной красной волчанкой (СКВ), 51 пациент с системной склеродермией (ССД), 35 практически здоровых лиц. При СКВ, так же как и при ССД, активность КО в плазме крови была повышена, в лизатах лимфоцитов – снижена; активность КДГ – снижена в лизатах лимфоцитов и эритроцитов. В отличие от СКВ, сопровождавшейся низкими показателями активности КДГ плазмы крови, для ССД было характерно повышение активности фермента в данной среде. Также при ССД был выявлен рост активности КО в лизатах эритроцитов, в то время как при СКВ значения этого показателя не отличались от значений здоровых лиц. Изменения активности ферментной системы КОР формируют характерные для СКВ и ССД профили крови, отражающие баланс оксидазной и дегидрогеназной активностей, что может способствовать уточнению некоторых метаболических звеньев патогенеза этих заболеваний.

Ключевые слова: системные заболевания соединительной ткани, системная красная волчанка, системная склеродермия, ксантиноксидоредуктаза, ксантиндегидрогеназа, ксантиноксидаза.

THE ACTIVITY OF XANTHINOXIDOREDUCTASE: PECULIARITIES OF BLOOD PROFILE IN SYSTEMIC CONNECTIVE TISSUE DISEASES

Mozgovaya E.E.¹, Bedina S.A.¹, Trofimenko A.S.¹, Spitsina S.S.¹, Mamus M.A.¹,
Zborovskaya I.A.¹

¹Federal State Budgetary Institution « Research Institute of Clinical and Experimental Rheumatology named after A.B. Zborovskiy», Volgograd, e-mail: ea.mozgovaya@gmail.com

Activities of xanthine oxidoreductase system enzymes (xanthine oxidase (XO, EC 1.17.3.2) and xanthine dehydrogenase (XDH, EC 1.17.1.4)) were studied in plasma, lysed lymphocytes and lysed red blood cells of the patients with systemic connective tissue diseases. The study included 56 patients with Systemic lupus erythematosus (SLE), 51 patients with Systemic scleroderma (SS) and 35 practically healthy people. The activity of XO in plasma was increased, in lysed lymphocytes – decreased; XDH activity was reduced in lysed lymphocytes and lysed red blood cells in SLE, as well as in SS. In contrast with SLE, which was accompanied by low levels of plasma XDH activity, SS was characterized by an increase of this enzyme activity. Also, the increase of XO activity in lysed red blood cells was revealed in SS, while the values of this indicator did not differ from the group of practically healthy people in SLE. Changes of the xanthine oxidoreductase system enzymes activities form characteristic blood profiles of SLE and SS, which reflect the balance of oxidase and dehydrogenase activities. This may help clarify of some metabolic links in the pathogenesis of these diseases.

Keywords: systemic connective tissue diseases, systemic lupus erythematosus, systemic scleroderma, xanthine oxidoreductase, xanthine dehydrogenase, xanthine oxidase.

Системные заболевания соединительной ткани объединяют группу патологий, в основе развития которых лежит иммуноопосредованный системный воспалительный процесс. Яркими по своим клиническим проявлениям представителями данной группы болезней являются системная красная волчанка (СКВ) и системная склеродермия (ССД). Оба заболевания сопровождаются полиорганностью поражений и вариабельной клинической симптоматикой. СКВ относится к аутоиммунным ревматическим заболеваниям неизвестной

этиологии, характеризуется гиперпродукцией органонеспецифических аутоантител к различным компонентам клеточного ядра, развитием иммуновоспалительного повреждения тканей и внутренних органов. Для ССД характерны иммунные нарушения и вазоспастические сосудистые реакции по типу феномена Рейно, сопровождающиеся активацией фиброобразования и избыточным отложением компонентов внеклеточного матрикса (коллагена) в тканях и органах [1].

Будучи представителями системных заболеваний соединительной ткани, СКВ и ССД имеют сходство некоторых клинических проявлений, что в ряде случаев, особенно на ранних стадиях развития патологического процесса, определяет сложности их дифференциальной диагностики. При этом оба заболевания сопровождаются глубокими иммунологическими нарушениями, имеющими наряду с общими характерные отличительные черты [2, 3]. Согласно современным представлениям, системность поражений формируется под воздействием как иммунопатологических механизмов, так и метаболических нарушений, развивающихся на клеточном и субклеточном уровнях [4, 5]. В работе представлены данные, подтверждающие роль активных форм кислорода и окислительного стресса, нарушений обмена пуриновых нуклеотидов в патогенезе СКВ и ССД [4-7].

Одним из активных участников эндогенного синтеза активных форм кислорода является ксантиноксидоредуктаза (КОР), катализирующая окислительное гидроксирование гипоксантина в ксантин и ксантина в мочевую кислоту. Благодаря особенностям строения и возможности существования в четырех формах фермент реализует дегидрогеназную, оксидазную, НАДН-оксидазную, нитратредуктазную активность. В результате катализируемых КОР реакций, помимо активных форм кислорода, образуются оксид азота, активные формы азота, которые наряду с важным физиологическим значением обуславливают развитие многих патофизиологических реакций, в том числе воспаления, окислительного стресса. Учитывая недостаточную изученность вопроса, интерес представляет анализ изменений активности взаимопревращающихся форм КОР (ксантиноксидазы (КО; ЕС 1.17.3.2) и ксантиндегидрогеназы (КДГ; ЕС 1.17.1.4)) в плазме и форменных элементах крови больных СКВ и ССД.

Цель исследования: получение представлений об особенностях профилей активности ксантиноксидазы и ксантиндегидрогеназы крови при СКВ и ССД.

Материал и методы исследования. В исследование были включены 56 больных СКВ, 51 больной ССД и 35 практически здоровых людей, составивших контрольную группу (табл. 1).

Демографическая характеристика включенных в исследование лиц

Показатели	СКВ (n=56)	ССД (n=51)	Здоровые лица (n=35)
Пол, n (%):			
мужской	5 (8,9)	4 (7,8)	19 (54,3)
женский	51 (91,1)	47 (92,2)	16 (45,7)
Средний возраст (лет), Me (Q ₂₅ ; Q ₇₅)	35 (31; 42)	43 (38; 48)	39 (34; 46)

Диагноз СКВ верифицирован в соответствии с критериями SLICC (2012) [1]. Длительность болезни составила 8 (5; 11), активность заболевания по индексу SLEDAI-2K [1] – 9 (5;11), SLICC/ACR Damage Index [1] – 2 (1; 3). Диагноз ССД был установлен на основании критериев ACR/EULAR (2013) [1]. Продолжительность болезни составила 8 (6; 9). У 34 (66,7%) больных выявлена лимитированная форма заболевания, у 17 (33,3%) – диффузная [1]. В соответствии с отечественными клиническими рекомендациями [1] низкая активность ССД диагностирована в 14 (27,5%), умеренная активность – в 28 (54,9%), высокая – в 9 (17,6%) случаях.

Активность ксантинооксидазы и ксантиндегидрогеназы определяли в плазме крови, лизатах лимфоцитов и эритроцитов. Клетки крови выделяли по методике А. Вöyum [8] в градиенте плотности 1,077–1,079 г/мл, создаваемом с помощью препарата Lymphosep (MP Biomedicals LLC). Лизаты готовились путем трехкратного замораживания-оттаивания с последующим центрифугированием. Активность ферментов определяли спектрофотометрическим методом и выражали в нмоль/мин/мл [9].

Статистическая обработка полученных данных выполнена с помощью программы STATISTICA 6. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (Me (Q₂₅; Q₇₅)). Для оценки различий количественных данных использовали критерий Манна–Уитни. Значимость различий подтверждалась при $p < 0,05$.

Исследование проведено в соответствии с общепринятыми этическими принципами и нормами на базе ревматологического отделения ГУЗ «ГКБСМП № 25» г. Волгограда.

Результаты исследования и их обсуждение. Включенные в исследование показатели ферментативной активности не зависели от пола и возраста здоровых лиц. В связи с этим данные факторы не учитывались при оценке результатов в группах больных СКВ и ССД. Референтные интервалы активности КО и КДГ в плазме и форменных элементах крови представлены в таблице 2.

Таблица 2

Интервалы активности ферментов в группе здоровых лиц (95-перцентильный интервал)

Фермент	Плазма	Лизаты лимфоцитов	Лизаты эритроцитов
КО	2,29–4,31	14,11–31,33	20,62–25,46
КДГ	4,52–5,97	18,62–39,65	41,89–55,04

Согласно полученным данным, во всех сравниваемых группах активность обеих форм КОР имела более высокие значения в лизатах лимфоцитов и эритроцитов (табл. 3). При этом у здоровых лиц активность дегидрогеназной формы превалировала во всех средах.

Таблица 3

Активность ферментов при системной красной волчанке и системной склеродермии

	Плазма		Лизаты лимфоцитов		Лизаты эритроцитов	
	КО	КДГ	КО	КДГ	КО	КДГ
Здоровые, n=35	3,28 (3,05; 3,38) ^{1,2}	5,30 (4,83; 5,41) ^{4,5}	20,94 (18,68; 22,67) ^{7,8}	29,76 (26,56; 33,70) ^{10,11}	23,51 (22,35; 24,57) ^{13,14}	50,13 (47,52; 52,11) ^{16,17}
СКВ, n=56	5,35 (4,37; 5,89) ^{1,3}	4,51 (4,24; 5,29) ^{4,6}	13,29 (12,22; 15,03) ^{7,9}	13,81 (12,55; 19,62) ^{10,12}	23,85 (20,97; 26,46) ^{13,15}	44,54 (38,72; 50,01) ^{16,18}
ССД, n=51	3,85 (3,37; 4,41) ^{2,3}	7,03 (6,43; 7,69) ^{5,6}	13,52 (11,25; 15,34) ^{8,9}	20,65 (18,74; 24,16) ^{11,12}	26,59 (23,29; 31,21) ^{14,15}	11,07 (9,66; 14,34) ^{17,18}
	p ¹ <0,001 p ² <0,001 p ³ <0,001	p ⁴ <0,001 p ⁵ <0,001 p ⁶ <0,001	p ⁷ <0,001 p ⁸ <0,001 p ⁹ =0,600	p ¹⁰ <0,001 p ¹¹ <0,001 p ¹² <0,001	p ¹³ =0,977 p ¹⁴ <0,001 p ¹⁵ <0,001	p ¹⁶ <0,001 p ¹⁷ <0,001 p ¹⁸ <0,001

Примечание: p¹, p⁴, p⁷, p¹⁰, p¹³, p¹⁶ – уровень значимости различий между показателями больных СКВ и здоровых лиц; p², p⁵, p⁸, p¹¹, p¹⁴, p¹⁷ – уровень значимости различий между показателями больных ССД и здоровых лиц; p³, p⁶, p⁹, p¹², p¹⁵, p¹⁸ – уровень значимости различий между показателями больных СКВ и ССД.

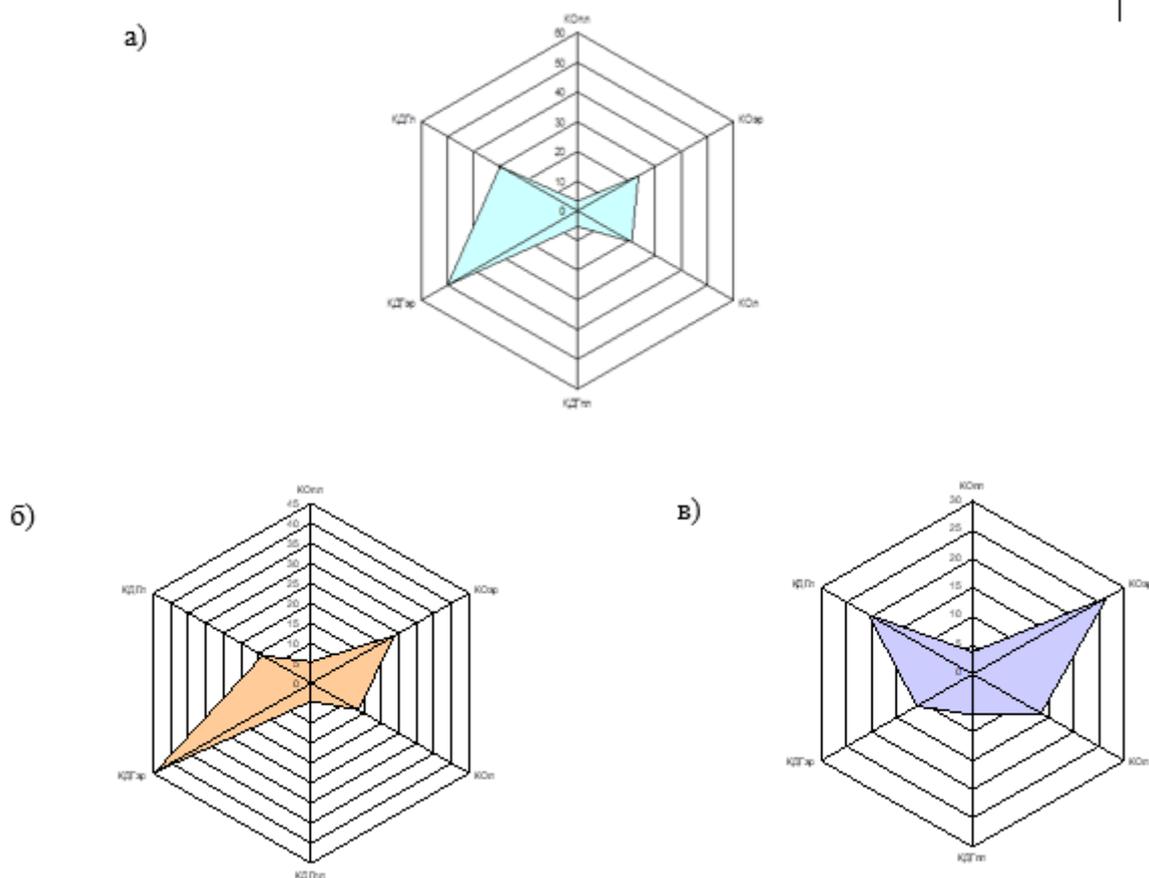
В группе больных СКВ, в отличие от контрольной группы, в плазме крови наблюдалась более высокая активность КО на фоне сниженной активности КДГ, в лизатах лимфоцитов была снижена активность обеих форм КОР, лизаты эритроцитов характеризовались снижением активности КДГ.

По сравнению с контролем в плазме крови при ССД отмечался рост активности КО и КДГ, в лизатах лимфоцитов – снижение активности обоих ферментов, в лизатах эритроцитов – повышение активности КО на фоне снижения активности КДГ.

Обращает внимание, что как при СКВ, так и при ССД активность КО в плазме крови была повышена, в лизатах лимфоцитов – снижена; активность КДГ – снижена в лизатах лимфоцитов и эритроцитов. В отличие от СКВ, сопровождавшейся низкими показателями

активности КДГ плазмы крови, для ССД было характерно повышение активности фермента в данной среде. Также при ССД был выявлен рост активности КО в лизатах эритроцитов, в то время как при СКВ значения этого показателя не отличались от группы здоровых лиц.

Выявленные в результате нашей работы изменения активности ферментной системы КОР формируют характерные для включенных в исследование нозологий профили крови, отражающие баланс оксидазной и дегидрогеназной активностей, что может способствовать уточнению некоторых метаболических звеньев патогенеза СКВ и ССД (рисунок).



Профили активности КОР крови: а) здоровые лица; б) больные СКВ; в) больные ССД. КОпл – активность КО в плазме крови; КОэр – активность КО в лизатах эритроцитов; КОл – активность КО в лизатах лимфоцитов; КДГпл – активность КДГ в плазме крови; КДГэр – активность КДГ в лизатах эритроцитов; КДГл – активность КДГ в лизатах лимфоцитов

Плазма крови является интегральной средой, отражающей в целом особенности происходящих в организме изменений метаболического уровня. Полученные при СКВ и ССД данные свидетельствуют о повышении активности оксидазной формы КОР, катализирующей реакции, сопровождающиеся образованием супероксидных радикалов, а также активности КДГ при ССД. Эти сдвиги могут быть обусловлены возрастом под действием

провоспалительных цитокинов экспрессии КОР и/или фосфорилированием молекулы фермента. К значительному росту активности КО на фоне снижения активности КДГ в группе больных СКВ, в том числе, может приводить трансформация дегидрогеназной формы в оксидазную, которая происходит за счет образования дисульфидных связей между остатками цистеина (Cys535 и Cys992) и/или ограниченного протеолиза между FAD и Mo-Co центрами [10].

Характерное для СКВ осаждение депозитов иммунных комплексов в стенках сосудов микроциркуляторного русла различных органов обуславливает развитие выраженного воспаления, создавая в тканях условия низкого рН, а при возникновении тромбозов – и гипоксии. Прогрессирующий генерализованный фиброз, поражение сосудов по типу облитерирующего эндартериолита, распространенный вазоспазм, тромбозы провоцируют при ССД гипоксию тканей. Известно, что в таких условиях КОР может реализовать NADH-оксидазную активность (преимущественно за счет дегидрогеназной формы), продуцируя супероксид и перекись водорода [11]. Помимо этого, в условиях гипоксии и кислотного рН уменьшается образование оксида азота под действием NO-синтазы и возрастает продукция супероксид-аниона; на фоне уменьшения сродства к ксантину увеличивается сродство КОР к нитритам и нитратам, что позволяет реализоваться нитратредуктазной активности фермента с образованием супероксида и оксида азота. При взаимодействии этих веществ генерируются активные формы азота, особенно высокореакционный пероксинитрит [11]. В то же время синтезируемый оксид азота в определенных концентрациях поддерживает адаптивный ответ, оказывая вазодилатирующее действие, ингибируя активность протеаз, участвующих в процессах апоптоза [12].

Образующиеся в результате интенсификации процессов свободно-радикального окисления активные формы кислорода и азота оказывают повреждающее действие на клеточные структуры, инициируют процессы перекисного окисления липидов, участвуют в стимуляции NF- κ B, контролирующего экспрессию генов, вовлеченных в процессы клеточной пролиферации, апоптоз, аутоиммунные и воспалительные реакции, способствуют образованию внеклеточных ловушек нейтрофилов (NET-Neutrophil Extracellular Trap) [12, 13]. Процесс образования NET называется NETоз и представляет собой вид программируемой гибели нейтрофилов. Высказывается гипотеза о ключевой роли NETоза в индукции аутоиммунитета и развитии поражения органов при СКВ, представлены данные об его активации при ССД [2].

Наблюдавшиеся в лизатах лимфоцитов больных СКВ и ССД однонаправленные изменения в виде снижения активности КО и КДГ в целом имеют позитивную направленность, поскольку в их результате происходит сокращение выработки активных форм кислорода,

обладающих прооксидантной и провоспалительной активностью. Однако нарушения обмена пуриновых метаболитов на предыдущих этапах способствуют изменению функциональных возможностей лимфоцитов. При этом как высокие, так и низкие концентрации аденозина и гуанозина могут вызывать замедление биосинтеза РНК, ДНК в этих форменных элементах, тормозить их созревание, пролиферацию, подавлять супрессорную функцию, оказывать цитотоксический эффект, приводя к гибели или усиленному апоптозу [5].

Анемия является одним из характерных проявлений СКВ. У пациентов с СКВ встречаются анемия хронического заболевания, железодефицитная анемия, аутоиммунная гемолитическая анемия, β -талассемия, циклофосфамид-индуцированная миелотоксичность, анемия, обусловленная хронической почечной недостаточностью, пернициозная анемия, тромбоцитопеническая пурпура, истинная апластическая анемия, различающиеся механизмами развития и требующие дифференциальной диагностики с гематологическими заболеваниями [14]. При ССД, особенно в случае длительного течения болезни, также могут выявляться анемия хронического заболевания, гемолитическая и пернициозная анемия [1]. В настоящем исследовании не ставился целью анализ энзимных показателей в зависимости от этой категории синдромов. В то же время следует отметить, что в эритроцитах больных как при СКВ, так и при ССД активность оксидазной формы КОР превалировала. При склеродермическом процессе изменения были более выражены. Учитывая данные литературы [15], можно предположить, что при системных заболеваниях соединительной ткани КОР реализует в эритроцитах нитритредуктазную активность, образуя свободные радикалы, которые могут оказывать влияние на продолжительность жизни этих форменных элементов.

Заключение. Таким образом, при СКВ и ССД в плазме крови, лизатах лимфоцитов и эритроцитов были выявлены изменения активности оксидазной и дегидрогеназной форм КОР, определяющие особенности профилей крови. Универсальность ряда иммунных и метаболических процессов, лежащих в основе защитных реакций организма, а также патологических каскадов, определяет некоторую общность патогенетических механизмов, формирующих системность поражений при диффузных болезнях соединительной ткани. Наряду с этим изменения баланса ферментативных активностей в системе КОР могут оказывать влияние на обмен пуриновых нуклеотидов, пул активных форм кислорода и азота в тканях организма, участвуя в присущих той или иной нозологии процессах.

Список литературы

1. Российские клинические рекомендации. Ревматология / под ред. Е.Л. Насонова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. 464 с.
2. Kaplan M.J. Role of neutrophils in systemic autoimmune diseases. *Arthritis Research & Therapy*. 2013. vol. 15. no. 5. P. 219-227. DOI: 10.1186/ar4325.
3. Garza-Rodríguez V., Villarreal-Alarcón M.A., Ocampo-Candiani J. Scleroderma: an update on the pathogenesis and treatment. *Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2013. vol. 51. no. 1. P. 50-57.
4. Бедина С.А., Трофименко А.С., Мозговая Е.Э., Зборовская И.А. Энзимное профилирование плазмы крови и лимфоцитов при системной красной волчанке: фокус на ферменты пуринового и пиримидинового метаболизма // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2019. Т. 63. № 3. С. 48-54. DOI:10.25557/0031-2991.2019.03.48-54
5. Зборовская И.А., Мозговая Е.Э., Трофименко А.С., Бедина С.А. Активность ферментов пуринового и пиримидинового метаболизма при системной склеродермии: энзимный профиль плазмы крови и лимфоцитов // *Успехи физиологических наук*. 2019. Т. 50. № 3. С. 83-91. DOI: 10.1134/S030117981903010X.
6. Shroff A., Mamalis A., Jagdeo J. Oxidative Stress and Skin Fibrosis. *Current Pathobiology Reports*. 2014. vol. 2. no. 4. P. 257-267. DOI: 10.1007/s40139-014-0062-y.
7. Ильин М.В., Мальцева П.А., Волкова А.С., Романов В.А., Хрусталеv О.А. Экспрессия факторов окислительного стресса и апоптоза нейтрофилов при развитии дисфункции миокарда у больных системной красной волчанкой и системной склеродермией // *Фундаментальные исследования*. 2011. № 9-1. С. 73-75.
8. Медицинские лабораторные технологии. Руководство по клинической лабораторной диагностике / под ред. А. И. Карпищенко. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. Т. 2. С. 274-314.
9. Мозговая Е.Э., Мартемьянов В.Ф., Стажаров М.Ю., Бедина С.А. Энзимодиагностика активности патологического процесса при ревматоидном артрите // *Врач-аспирант*. 2011. № 4. С. 45-50.
10. Battelli M.G., Polito L., Bortolotti M., Bolognesi A. Xanthine Oxidoreductase in Drug Metabolism: Beyond a Role as a Detoxifying Enzyme. *Current Medicinal Chemistry*. 2016. vol. 23. no. 35. P. 4027-4036. DOI: 10.2174/0929867323666160725091915.
11. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К., Бондарь И.А., Круговых Н.Ф., Труфакин В.А. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, 2006. 556 с.

12. Cantu-Medellin N., Kelley E.E. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biology*. 2013. vol. 1. no. 1. P. 353-358. DOI: 10.1016/j.redox.2013.05.002.
13. Головач И.Ю. Ядерный фактор NF- κ B (NF- κ B) как важный патогенетический фактор и новая мишень в лечении ревматических заболеваний // Рациональная фармакотерапия. 2012. № 3 (24). С. 44-51.
14. Петров В.А., Белоглазов В.А., Захарова С.Н. Анемия и системная красная волчанка: история одного непростого диагноза // Украинский ревматологический журнал. 2008. № 3 (33). С. 65-70.
15. Ghosh S.M., Kapil V., Fuentes-Calvo I. et al. Enhanced vasodilator activity of nitrite in hypertension: critical role for erythrocytic xanthine oxidoreductase and translational potential. *Randomized Controlled Trial Hypertension*. 2013. vol. 61. no. 5. P. 1091-1102. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00933.